云南植物研究 2009，31 (4)：363～368
Acta Botanica Yunnanica DOI：10.3724 SP.J.1143.2009.09017

热胁迫对豌豆下胚轴生理的一些影响

田学军[1]，陶宏征[1]，罗 晶[1]，张旭东[2]，陶发清[2]
（1 红河学院生物系，云南 蒙自 661100；2 中国科学院昆明植物研究所，云南 昆明 650204）

摘要：通过测定热驯和热胁迫下 3 个豌豆品种幼苗下胚轴生长、细胞膜损伤、抗坏血酸（AsA）和丙二醛（MDA）含量的变化及热激蛋白 70（HSP70）表达，探讨热胁迫对豌豆生理的影响。结果表明，在 48℃高温胁迫下豌豆种子萌发率下降，幼苗下胚轴生长受抑制，细胞膜受损，AsA 含量下降，MDA 含量升高；经 37℃热驯再 48℃热激处理的下胚轴长度和 AsA 明显高于直接热胁迫的，细胞膜受损程度和 MDA 含量则低于后者。HSP70 测定表明，除台湾品种外，37℃热驯 1 h 不足以诱导 HSP70 表达；而 37℃热驯后常温恢复再 48℃热激和直接 48℃热激均能诱导 HSP70 表达，其中蒙自品种经热驯后再热激的 HSP70 表达量高于直接热激的。

关键词：豌豆；下胚轴；热胁迫；生理变化；HSP70
中图分类号：Q 945 **文献标识码**：A **文章编号**：0253-2700 (2009) 04-363-06

Physiological Effect of Heat Stress on Pea (*Pisum sativum*) Hypocotyls

TIAN Xue-Jun[1]，TAO Hong-Zheng[1]，LUO Jing[1]，
ZHANG Xu-Dong[2]，TAO Fa-Qing[2]
(1 *Department of Biology*, *Honghe University*, Mengzi 661100, China; 2 *Kunming Institute of Botany*,
Chinese Academy of Sciences, Kunming 650204, China)

Abstract: To explore the physiological effect of heat stress on pea (*Pisum sativum*), hypocotyl growth, membrane injury, ascorbic acid (AsA), malondialdehyde (MDA) and the expression of Heat Shock Protein 70 (HSP70) in seedling hypocotyls of three pea varieties (produced in Mengzi, Shandong and Taiwan) under different heat treatments were examined. The results showed heat stress at 48℃ resulted in decrease in germination rate of seeds and AsA content of seedling hypocotyls, and increase in membrane injury and MDA content. Longer hypocotyls of pea seedling along with higher level of AsA content, membrane thermostability and lower MDA content were found in the germinated seeds which were acclimated at 37℃ for 1 h before heat stress at 48℃, comparing with no heat-acllimated germinated seeds (heat stres directly at 48℃). Except for the Taiwan pea, heat acclimation at 37℃ for 1 h couldn't induce the expression of HSP70 in the other two varieties. However, the expression of HSP70 in all three varieties was induced by two other different heat treatments, which one was treated at 37℃ for 1 h followed by 48℃ for 2 h with recovery at 22℃ for 1 h and the other treatment was at 48℃ for 2 h. Furthermore, the expression of HSP70 of Mengzi pea was higher when suffering heat stress after heat acclimation heat stress directly.

Key words: Pea (*Pisum sativum*); Hypocotyls; Heat stress; Physiological Change; HSP70

热胁迫是抑制植物生长的主要非生物因子之一 (Larkindale and Huang, 2004)。在研究热胁迫对植物生理的影响时，人们更多研究的是地上部份。其实，根比茎对高温更敏感 (McMichael, 1998)。土壤高温比空气高温对植物更有害，它抑制茎的生长、光合作用、细胞分裂素的合成

收稿日期：2009-02-04，2009-05-21 接受发表

作者简介：田学军（1962-）男，副教授，主要从事植物逆境生理学和资源植物研究。E-mail：txj_biology2@126.com

等，导致叶片老化（Liu and Huang，2005）。在筛选耐热突变体时，地下部份有重要的应用价值。Hong and Vierling（2000）根据高温胁迫下下胚轴生长情况提出了筛选 *Arabidopsis thaliana* 突变体的方法。此外，为抵御高温胁迫，植物迅速增加热激蛋白（HSPs）的合成，对突然升高的温度作出应答（Hirt and Shinozaki，2003）。

豌豆（*Pisum sativum* L.）为蝶形花科热敏性作物，生长适宜温度为16～23℃（鲁福成和张仲国，2002），环境温度超过26℃将导致豌豆品质下降和减产，但人们对其生理学基础了解还不多。本研究以3个豌豆品种幼苗下胚轴为研究材料，通过热胁迫，探讨高温对下胚轴生长、细胞膜损伤、膜脂过氧化物和抗氧化剂的影响，并测定热激蛋白 Hsp70 的表达，进而分析高温对豌豆生长发育影响的生理学基础。

1 材料和方法

1.1 主要试剂与设备

PVDF膜（Millipore公司），HSP70抗体（Agrisera公司），Goat anti-rabbit IgG AP-conjugated（Pierce公司），NBT和BCIP（Ameresco公司），TCA，TBA，硫脲，二硝基苯肼，抗坏血酸（AsA）。电导率仪（JEY-45001，Jenway，England），冷冻离心机（Eppendrof Centrifuge 5810 R，Germany），分光光度计（TU-1901，北京普析），SE 250 Mini-Vertical Gel Electrophoresis Unit 和 ECL Semi-dry Blotters（Amersham Biosciences）。

1.2 种子萌发率和幼苗下胚轴生长测定

3个豌豆品种种子购自种子商店，分别产自云南蒙自（本地品种）、山东临朐蔬菜种苗研究所、台湾福田种子有限公司。种子在4℃春化24 h；转22℃避光培养约24 h（种子刚要萌发），随机分成下列3组，每组50粒。各组经处理、培养后，拍照并测定下胚轴长度。

1.2.1 对照组（CK） 种子在22℃培养36 h。

1.2.2 热驯→热胁迫组（37℃ HA→48℃ HS） 种子放37℃水浴热驯1 h，转22℃恢复1 h，再放入48℃水浴热胁迫2 h，转22℃培养36 h。转入22℃恢复1 h的目的是让供试植物对热驯有一个生理适应过程。

1.2.3 热胁迫组（48℃ HS） 种子直接放48℃水浴胁迫2 h，转22℃培养36 h。

1.3 用于测定下胚轴细胞膜损伤、AsA、MDA和Hsp70的种子培养

种子于4℃春化24 h；转22℃避光培养至下胚轴长约1.5 cm；备用。

1.4 热胁迫方法

将1.3培养的种子随机分成：（1）对照组（CK）种子放22℃ 2 h；（2）37℃热驯组（37℃ HA）种子放37℃水浴热驯1 h；（3）热驯→热胁迫组（37℃ HA→48℃HS）种子放37℃水浴热驯1 h，转22℃恢复1 h，再放入48℃水浴中胁迫2 h；（4）热胁迫组（48℃ HS）种子直接放48℃水浴胁迫2 h。经上述处理的种子，取其下胚轴，用于各生理指标测定。

1.5 细胞膜热损伤测定

参照 Xu 等（2006）方法，用相对损伤率（RIR）表达损伤程度。

1.6 MDA测定

参照田学军等（2008a）硫代巴比妥酸法。

1.7 AsA测定

参照田学军等（2008a）二硝基苯肼法。

1.8 HSP70测定

1.8.1 总蛋白提取及定量 取5～6颗豌豆下胚轴，加0.5 ml提取液（50 mmol L^{-1} Tris，10 mmol L^{-1} KCl，1 mmol L^{-1} EDTA，pH8.0），2 μl β-巯基乙醇，2.5 μl PMSF，在预冷的研钵中充分研磨匀浆，转移至1.5 ml洁净离心管。4℃离心，7 000 r min^{-1}，10 min，转移上清至1.5 ml洁净离心管。运用 Bradford 方法测定蛋白浓度。

1.8.2 Western Blot 运用 SDS-PAGE 方法分离蛋白，每个样品上样约100 μg总蛋白。电泳结束后运用半干转印法将PAGE胶中已分离的蛋白转印至PVDF膜。一抗杂交，HSP70抗体以1∶1000稀释，室温孵育PVDF膜4h。二抗杂交，耦联碱性磷酸酶的羊抗兔 IgG（Goat anti-rabbit IgG，AP-conjugated）以1∶3000稀释，室温孵育PVDF膜2 h。最后在显色缓冲液（100 mmol L^{-1} NaCl，5 mmol L^{-1} $MgCl_2$，100 mmol L^{-1} Tris，pH9.5）中加入 NBT 和 BCIP，避光显色1 h。

1.9 统计分析

用SPSS14.0统计软件进行方差分析，以比较各处理的差异性。

2 结果

2.1 热胁迫对豌豆种子萌发率和下胚轴生长的影响

热胁迫使3个豌豆品种种子的萌发率有所下降（表1）。本地品种和山东品种37℃ HA→48℃ HS处理和48℃ HS处理的下胚轴长度明显短于对照（$P < 0.01$），但台湾品种差异不显著（$P > 0.05$）；本地品种37℃ HA→48℃ HS处理的明显长于48℃ HS处理的（$P < 0.01$），山东品种和台湾品种的差异不显著（$P > 0.05$）（表1）。图1是已萌发的种子热胁迫后培养36 h下胚轴生长情况。

表 1　热驯和热胁迫下不同豌豆品种幼苗下胚轴生长和种子萌发率（50 个重复）

Table 1　Growth of hypocotyls and germinative rate of different pea varieties under heat acclimation and stress (50 replicates)

处理 Treatment	种子萌发率 Germinative rate of seeds (%)			下胚轴长度 (mean + SD) Hypocotyl length (mm) (mean + SD)		
	本地品种 Local variety	山东品种 Shandong variety	台湾品种 Taiwan variety	本地品种 Local variety	山东品种 Shandong variety	台湾品种 Taiwan variety
CK	100	90	98	19.7 + 8.7	13.8 + 5.3	7.1 + 3.2
37℃ HA→48℃ HS	96	88	98	9.6 + 6.0	7.1 + 4.7	5.6 + 2.9
48℃ HS	90	86	96	6.8 + 4.2	5.0 + 3.0	4.7 + 2.1

37℃ HA→48℃ HS 表示已萌发的种子先在 37℃热训 1 h，然后在 22℃恢复 1 h，最后在 48℃热胁迫 2 h；48℃ HS 表示已萌发的种子直接在 48℃热胁迫 2 h

37℃ HA→48℃ HS is expressed as the germinated seeds were acclimated at 37℃ for 1 h; followed at 22℃ for 1 h; and then stressed at 48℃ for 2 h. 48℃ HS is expressed as the seeds were stressed at 48℃ for 2 h

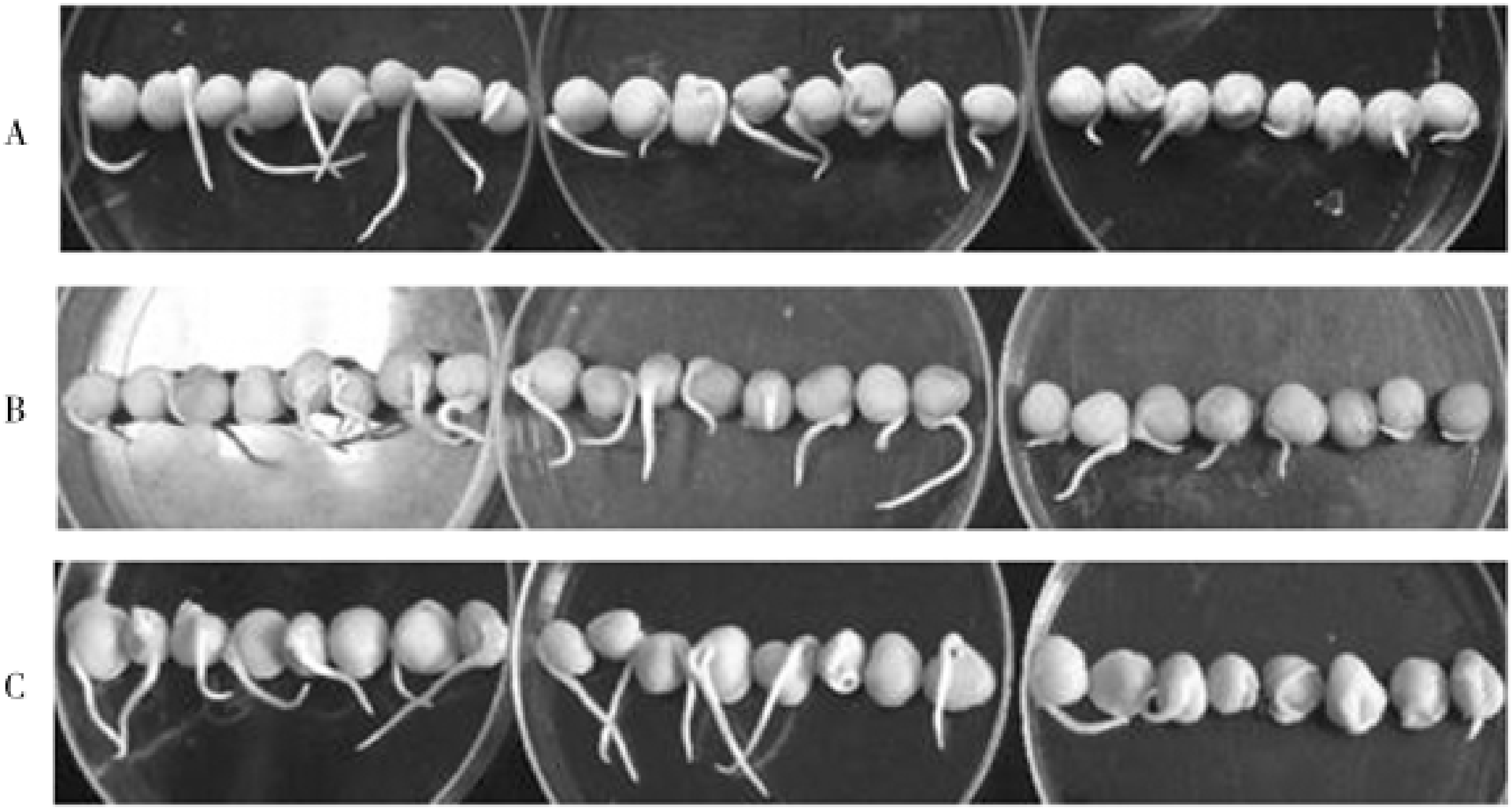

图 1　不同豌豆品种热驯和热胁迫后在 22℃避光培养 36 h 幼苗下胚轴生长情况

（A，本地品种；B，山东品种；C，台湾品种）；左，对照（22℃）；中，37℃ HA→48℃ HS；右，48℃ HS

Fig. 1　Hypocotyl elongation phenotype of different pea varieties for 36 h in the dark at 22℃ after heat acclimation and stress

(A, Local variety; B, Shandong variety; C, Taiwan variety). Left is expressed as control (22℃); Middle is expressed as the germinated seeds were acclimated at 37℃ for 1 h, followed at 22℃ for 1 h, and then stressed at 48℃ for 2 h. Right is expressed as the seeds were stressed at 48℃ for 2 h

显然，热胁迫严重影响下胚轴的生长，热驯适当提高了种子的抗热性。

2.2　热驯和热胁迫对 MTS 的影响

3 个品种 37℃ HA→48℃ HS 处理和 48℃ HS 处理的相对电导率和损伤指数明显高于对照（$P<0.01$）；对照与 37℃ HA 处理的差异不显著（$P>0.05$），37℃ HA→48℃ HS 处理与 48℃ HS 的差异也不显著（$P>0.05$）（表 2）。结果表明，细胞膜的损伤程度随胁迫温度的升高而增加。本研究中，热驯对细胞膜的保护作用不明显。

2.3　热驯和热胁迫对 MDA 和 AsA 含量的影响

3 个品种 48℃ HS 的下胚轴 MDA 含量明显高于对照（$P<0.01$）；本地品种 37℃ HA→48℃ HS 与对照差异显著（$P<0.05$），其余 2 个品种与对照差异不显著（$P>0.05$）；3 个品种 37℃ HA 处理与对照、37℃ HA→48℃ HS 和 48℃ HS 处理差异均不显著（$P>0.05$）；3 个品种 37℃ HA→48℃ HS 与 48℃ HS 处理的差异也不显著（$P>0.05$）（图 2）。结果表明，48℃高温胁迫使下胚轴膜脂更多地被氧化；本研究中，热驯对提

表 2 热驯和热胁迫对豌豆下胚轴相对电导率和损伤指数的影响 (6 个重复)

Table 2 Effect of heat acclimation and stress on relative conductivty and injury rate of hypocotyls of different pea varieties (6 replicates)

处理 Treatment	相对电导率 (mean + SD) Relative conductance (%) (mean + SD)			损伤指数 Relative injury rate (%)		
	本地品种 Local variety	山东品种 Shandong variety	台湾品种 Taiwan variety	本地品种 Local variety	山东品种 Shandong variety	台湾品种 Taiwan variety
CK	11.0 + 2.0	15.0 + 2.1	20.5 + 4.9			
37℃ HA	12.0 + 6.0	15.2 + 2.4	25.8 + 4.9	1.1	0.3	7.2
37℃ HA→48℃ HS	18.0 + 8.0	29.1 + 5.3	32.6 + 5.8	7.9	16.6	15.8
48℃ HS	23.0 + 9.0	34.8 + 5.6	33.9 + 5.7	13.5	23.3	17.4

37℃ HA 表示已萌发的种子在 37℃热训 1 h; 37℃ HA→48℃ HS 表示已萌发的种子先在 37℃热训 1 h, 然后在 22℃恢复 1 h; 48℃ HS 表示已萌发的种子直接在 48℃热胁迫 2 h

37℃ HA is expressed as the germinated seeds were acclimated at 37℃ for 1 h .37℃ HA→48℃ HS is expressed as the seeds were acclimated at 37℃ for 1 h; followed at 22℃ for 1 h; and then stressed at 48℃ for 2 h . 48℃ HS is expressed as the seeds were stressed at 48℃ for 2 h

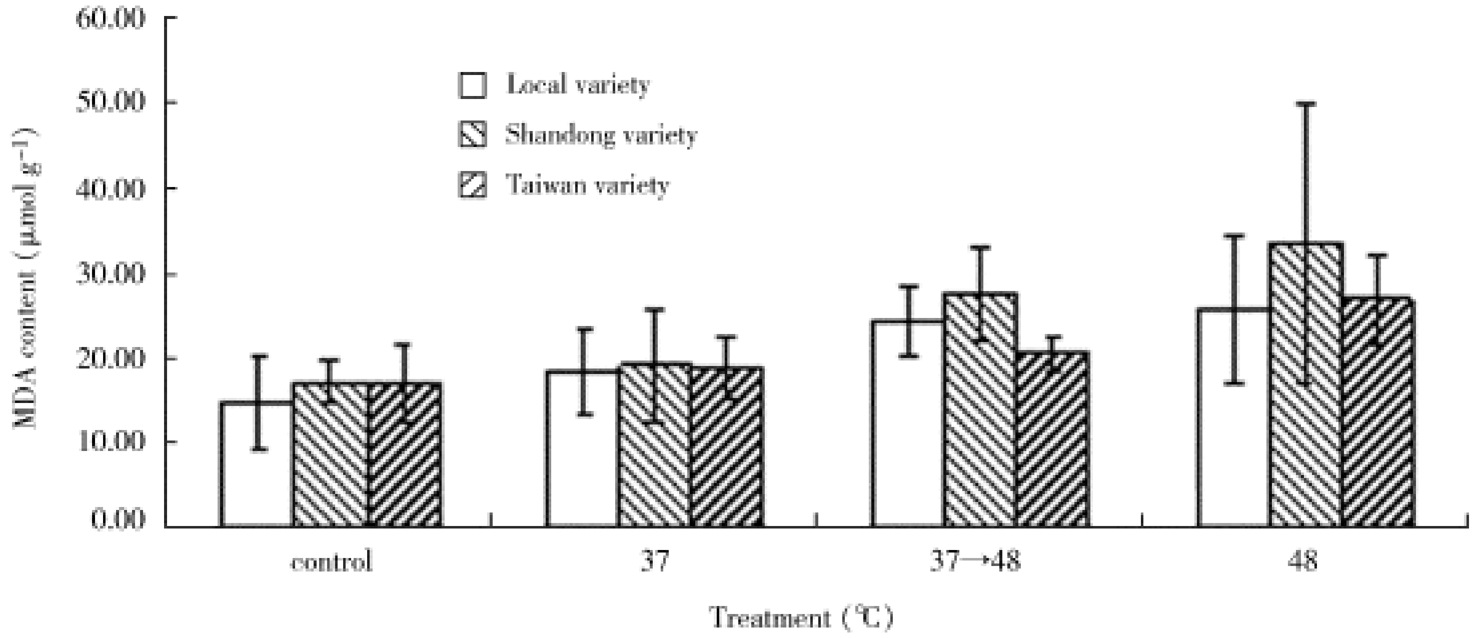

图 2 热驯和热胁迫对不同豌豆品种幼苗下胚轴 MDA 含量的影响 (mean + SD, 6 个重复)

Fig . 2 Effect of heat acclimation and stress on hypocotyl MDA content of different pea varieties (mean + SD, 6 replicates)

高下胚轴的抗氧化能力不明显。

3 个品种 48℃ HS 处理的 AsA 含量明显低于对照 ($P < 0.01$); 山东和台湾品种 37℃ HA→48℃ HS 处理的 AsA 含量也明显低于对照 ($P < 0.01$), 本地品种高于对照; 本地品种 37℃ HA→48℃ HS 处理的 AsA 含量明显高于 48℃ HS ($P < 0.01$), 山东和台湾品种 37℃ HA→48℃ HS 处理虽然高于 48℃ HS 处理, 但差异不明显 ($P > 0.05$) (图 3)。结果表明, 高温使豌豆下胚轴 AsA 含量下降, 而热驯能适当提高 AsA 的表达。

2.4 热驯和热胁迫对 HSP70 表达的影响

3 个品种豌豆在 22℃正常生长条件下都没检测到 HSP70。37℃热驯 1 h 后检测 HSP70, 只有台湾品种的 HSP70 被诱导大量表达。37℃热驯 1 h 后 22℃恢复 1 h 然后 48℃热激 2 h (37℃ HA→48℃ HS), 3 个品种的 HSP70 都被诱导表达, 其中台湾品种 HSP70 表达量远高于另外 2 个品种, 本地品种次之, 山东最低。直接进行 48℃热激 2 h (48℃ HS), 3 个品种的 HSP70 也都被诱导表达, 同样是台湾品种的 HSP70 表达量远高于另外 2 个品种, 本地豌豆次之, 山东品种最低。

在 3 个不同高温处理中, 台湾品种在 37℃热驯后 HSP70 表达量最高, 热驯后热激和直接热激处理 HSP70 都被诱导, 但差异不明显; 山东品种在 37℃热驯后 HSP70 未被诱导, 而热驯后热激和直接热激 HSP70 都诱导表达, 但差异不明显; 本地品种同样在 37℃热驯后 HSP70 未被诱导, 热驯后热激和直接热激 HSP70 都诱导表达, 但与山东品种不同的是, 本地品种热驯后热激的 HSP70 表达量明显高于直接热激 (图 4)。

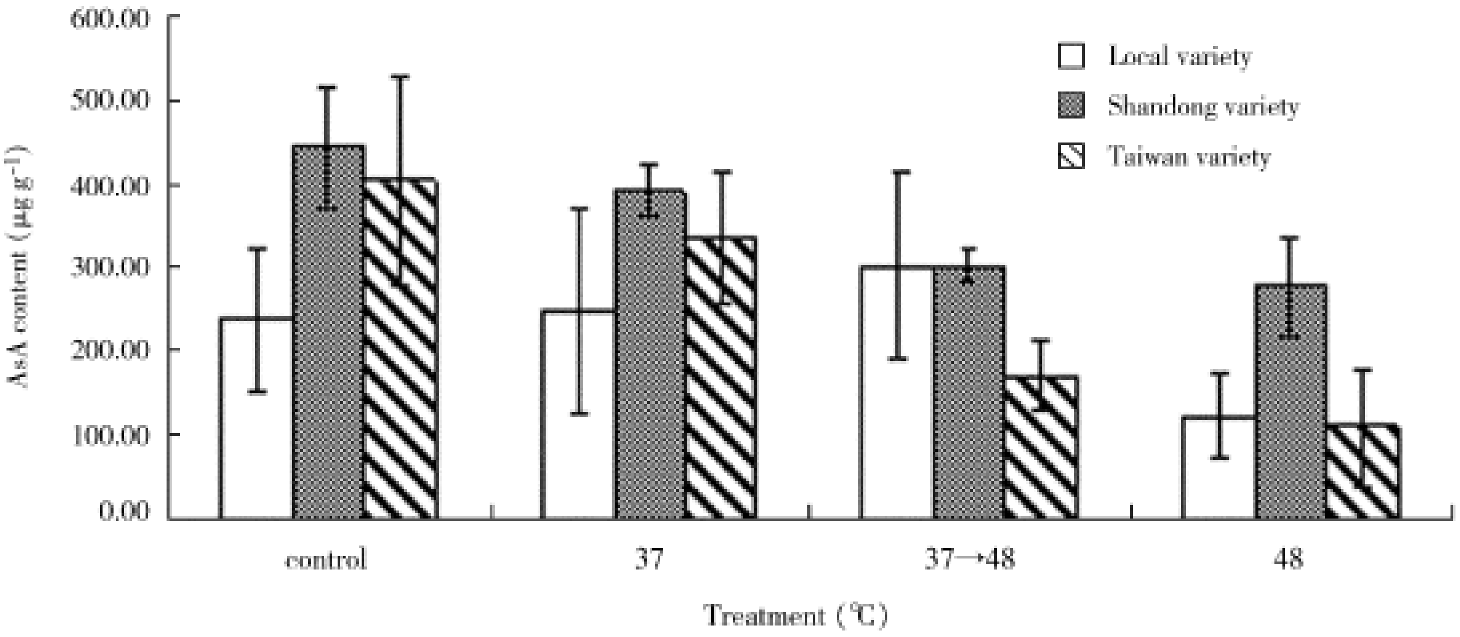

图 3　热驯和热胁迫下豌豆下胚轴抗坏血酸含量的变化（mean + SD，6 个重复）

Fig . 3　Change of hypocotyl AsA content of different pea varieties under heat acclimation and stress (mean + SD，6 replicates)

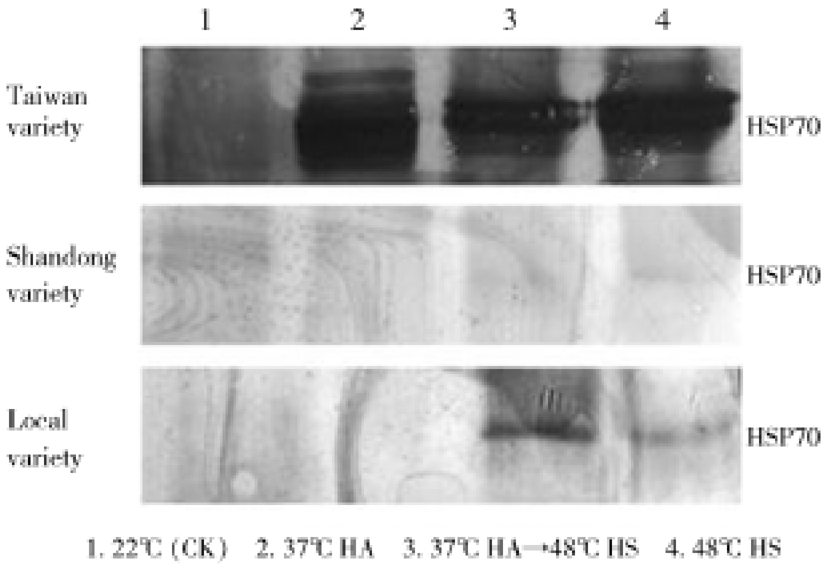

图 4　热驯和热胁迫对豌豆品种下胚轴 HSP70 表达的影响

Fig . 4　Effect of heat acclimation and stress on the expression of HSP70 in hypocotyls of different pea varieties

3　讨论

通过将植物暴露在适度高温下短时热驯可使其产生获得性耐热性。这种耐热性以热激蛋白的产生为显著特征，热激蛋白大量（HSPs）诱导转录和翻译（Larkindale 等，2005）。除 HSPs 外，植物还运用包括膜稳定性修复、活性氧中间体（ROS）清除、抗氧化剂产生等各种机制，以抵御热胁迫（Wahid 等，2007）。

Hong and Vierling（2000）研究表明，在高温胁迫下，耐热性较强的拟南芥（*Arabidopsis thaliana*）突变体的下胚轴生长量较热敏性的大。Liu and Huang（2005）研究表明，匍茎剪股颖（*Agrostis stolonifera* var. *palustris*）根的生物量随着热胁迫而减少，死亡则随之增加。本研究表明，在 48℃高温胁迫下，不同豌豆品种幼苗下胚轴的长度明显短于正常条件生长的；同时，经热驯后返回正常生长条件下恢复 1 h 再进行高温胁迫，下胚轴长度明显长于直接高温胁迫的。尽管热驯后再高温胁迫的种子下胚轴长度也明显低于对照的，但它却明显长于直接高温胁迫的。显然，热驯提高了豌豆幼苗的耐热性。

植物遭受高温胁迫时，细胞膜受损，而电解质渗透增加表明细胞膜已受损（Marcum，1998）。本研究表明，热胁迫使豌豆下胚轴细胞膜损伤指数提高，热驯后损伤指数则低于直接高温胁迫的，说明热驯期间豌豆运用细胞膜修复能力，在一定程度保证了下胚轴细胞膜的完整性。

AsA 是植物 ROS 清除系统中的重要抗氧化剂之一，在热胁迫下 AsA 含量下降（李忠光和龚明，2007；田学军等，2008b）。本研究中，热胁迫的幼苗下胚轴 AsA 含量明显低于正常生长和经热驯再热激的，这一结果可能反映了直接高温胁迫使 AsA 表达受到一定影响，而经 37℃热驯诱导 AsA 高量表达。

HSP70 测定结果表明，3 个豌豆品种在正常温度下均没有检测到 HSP70，37℃热驯 1 h 后只有台湾品种表达 HSP70；经热驯后在正常温度下恢复 1 h 再高温胁迫 2 h，3 个品种都表达 HSP70。此结果说明，就本研究而言，在 37℃热驯 1 h 尚不足以诱导 HSP70 表达；同等热驯条件下，在正常温度下经过一定时间的生理恢复，豌豆对热驯和后续的高温胁迫有一个生理适应过程，能产

生 HSP70，以获得耐热性。此外，HSP70 表达在品种之间存在差异。Srikanthbabu 等 (2002) 研究表明，经热驯的豌豆幼苗比直接高温胁迫的幼苗积累更多的 HSP70 转录物，表现出更高的恢复生长。本研究结果与之相似。

在本研究中，豌豆下胚轴细胞膜损伤、MDA 和 AsA 含量的变化趋势与田学军等 (2008b) 用豌豆离体叶片的研究结果一致。纵观本研究，热胁迫降低了豌豆种子的萌发力，幼苗下胚轴生长受抑制，细胞膜受损，膜脂更多地被氧化，抗氧化剂 AsA 含量下降；热驯能适当提高豌豆下胚轴的耐热性。与此同时，热胁迫也诱导豌豆下胚轴 HSP70 表达，以提高耐热性。由于根系承担水份、无机盐等植物生长发育所需营养物质的吸收，热胁迫对豌豆根部造成的不利影响，可能影响地上部份的生长发育，进而影响豌豆产量和质量。

致谢 中国科学院昆明植物研究所李唯奇博士给予指导。

〔参 考 文 献〕

Hirt H, Shinozaki K (eds.), 2003. Plant Responses To Abiotic Stress [A]. In: Topics in Current Genetics [M]. Heidelberg: Springer Berlin, vol. 4: 73—92

Hong SW, Vierling E, 2000. Mutants of *Arabidopsis thaliana* defective in the acquisition of tolerance to high temperature stress [J]. *PNAS*, 97: 4392—4397

Larkindale J, Hall JD, Knight MR *et al.*, 2005. Heat stress phenotypes of *Arabidopsis* mutants implicate multiple signaling pathways in the acquisition of thermotolerance [J]. *Plant Physiology*, 138: 882—897

Larkindale J, Huang B, 2004. Changes of lipid composition and saturation level in leaves and roots for heat-stressed and heat-acclimated creeping bentgrass (*Agrostis stolonifera*) [J]. *Environmental and Experimental Botany*, 51: 57—67

Li ZP (李忠光), Gong M (龚明), 2007. Involvement of antioxidant systems in heat-shock-induced heat tolerance in maize seedlings [J]. *Acta Botanica Yunnanica* (云南植物研究), 29 (2): 231—236

Liu X, Huang B, 2005. Root physiological factors involved in cool-season grass response to high soil temperature [J]. *Environmental and Experimental Botany*, 53: 233—245

Lu FC (鲁福成), Zhang ZG (张仲国), 2002. Current Situation of Pea (*Pisum sativum* L.) Varieties in China and Introduction of New Pea Varieties in Tianjin [J]. *Journal of Tianjin Agricultural College* (天津农学院学报), 9 (4): 42—45

Marcum KB, 1998. Cell membrane thermostability and whole-plant heat tolerance of Kentucky bluegrass [J]. *Crop Sci*, 38: 1214—1218

McMichael BL, 1998. Soil temperature and root growth [J]. *HortScience*, 33: 947—951

Srikanthbabu V, Ganeshkumar, Krishnaprasad BT *et al.*, 2002. Identification of pea genotypes with enhanced thermotolerance using temperature induction response technique (TIR) [J]. *Journal of Plant Physiology*, 159 (5): 535—545

Tian XJ (田学军), Long YH (龙云惠), Zhang DG (张德刚) *et al.*, 2008a. Effect of high temperature on the cell membrane, membrane lipid, and ascorbic acid metabolism in rauwolfia (*Rauvolfia vericillata*, Apocynaceae) [J]. *Acta Botanica Yunnanica* (云南植物研究), 30 (1): 95—98

Tian XJ (田学军), Luo Q (罗谦), Zhao HM (赵洪木) *et al.*, 2008b. Influences of heat stress onthe physiology of *Pisum sativum* L. [J]. *Journal of Anhui Agricultural Science* (安徽农业科学), 36 (13): 5263—5264

Wahid A, Gelani S, Ashrafa M *et al.*, 2007. Heat tolerance in plants [J]. *Environmental and Experimental Botany*, 61 (3): 199—223

Xu S, Li J, Zhang X *et al.*, 2006. Effects of heat acclimation pretreatment on changes of membrane lipid peroxidation, antioxidant metabolites, and ultrastructure of chloroplasts in two cool-season turfgrass species under heat stress [J]. *Environmental and Experimental Botany*, 56: 274—285